

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA *SALMONELLA* DURANTE PROCESSAMENTO TÉRMICO DE CONCHAGEM DE CHOCOLATE AO LEITE.

ÉRIKA M. REOLON¹; DANIELA M. BRUM, FABIANA TAMINATO, PRISCILLA EFRAIM, NEUSELY DA SILVA ²; MARISTELA DA S. DO NASCIMENTO³.

Nº10220

Resumo

Pouco se sabe sobre a presença de *Salmonella* em produtos brasileiros derivados do cacau e em chocolate, e sobre o comportamento do patógeno nas etapas do processamento do cacau. O presente trabalho teve como objetivos padronizar o inóculo de *Salmonella* em sementes, amêndoas e liquor de cacau para posterior análise do microorganismo durante o processamento do cacau, e determinar a resistência térmica da *Salmonella* durante a conchagem de chocolate ao leite, nas temperaturas de 50°C, 60°C e 70°C por 3, 8, 15 e 24 horas. Para a determinação da população de *Salmonella* foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (N.M.P). Os protocolos escolhidos para a obtenção de inóculo inicial entre 10^3 - 10^4 NMP/g para semente e liquor foram 250g de amostra, 0,1 mL de inóculo com escala de Mac Farland 1,0 e 75g de amostra, 0,5 mL de inóculo com escala de Mac Farland 0,5, respectivamente. Com relação a amêndoa seca, o procedimento adotado para atingir população microbiana de 10^6 NMP/g foi inoculação direta de 0,5 mL do “pool” do inóculo em 50g de amostra. Os resultados mostraram que a conchagem a 70°C promoveu maior inativação do patógeno, com reduções entre 3,53 e >5,37 log NMP/10g. Sob a temperatura de 60°C a redução variou de 1,76 a 4,35 log NMP/10g. As menores reduções, entre 0,83 e 2,10 log NMP/10g, foram obtidas a 50°C. Portanto, os resultados demonstram que se a contaminação inicial em chocolate ao leite for alta (>4 log NMP/10g), a conchagem não pode garantir eliminação completa da *Salmonella*.

1. Bolsista CNPq: Graduação em Farmácia, Universidade São Francisco, Campinas-SP

✉ erika_reolon@yahoo.com.br

2. Colaboradores: CCQA -MICROBIOLOGIA/ITAL; Cereal-Chocotec/ITAL.

3. Orientadora: Pesquisadora, CCQA -MICROBIOLOGIA/ITAL, Campinas-SP

Abstract

Little is known about the presence of *Salmonella* in Brazilian cocoa and chocolate, and on its behavior in the steps of the cocoa processing. This study aimed to standardize the *Salmonella* inoculum on fermented and dry cocoa bean and on cocoa liquor. As well the thermal resistance of *Salmonella* during the conching of milk chocolate at 50°C, 60°C and 70°C for 3, 8, 15 and 24 hours was studied. The *Salmonella* count was carried out by the Most Probable Number Method (MPN). The protocols chosen to obtain initial inoculum between 10^3 - 10^4 MPN/g for fermented cocoa bean and cocoa liquor were 250g of sample, 0.1 mL of inoculum with Mac Farland scale of 1.0 and 75g of sample, 0.5 mL of inoculum Mac Farland scale with 0.5, respectively. Regarding the dry cocoa bean, the procedure adopted to reach microbial population of 10^6 MPN/g was by the direct inoculation of 0.5 mL of inoculum in 50g of sample. Results showed that the treatment at 70° C caused the largest inactivation in all of the periods tested, with a reduction between 3.19 and >5.37 log MPN/10g. At 60° C the viable count reduction ranged from 1.76 to 4.35 log MPN/10g. The lowest reductions, between 0.83 and 2.10 log MPN/10g, were obtained at 50° C. Therefore, the results demonstrated that, if initial contamination is high (>4 log MPN/10g) in milk chocolate, the conching process cannot ensure the complete elimination of the *Salmonella*, even though it is able to reduce the initial count.

Introdução

Os surtos decorrentes do consumo de chocolate são conhecidos desde 1960 (D'AOUST, 1977) e, apesar do desenvolvimento tecnológico, continuam ocorrendo até hoje. Na maioria dos casos, os surtos foram epidêmicos, disseminados geograficamente e atingiram um grande número de pessoas, principalmente crianças (WERBER *et al.*, 2005). Nos casos em que foi determinada, a população de *Salmonella* no produto era muito baixa (≤ 1 a 23 UFC/g). Sendo assim, fica claro que a presença deste patógeno mesmo em baixa concentração representa um risco à saúde do consumidor.

A baixa atividade de água (aw) e a alta concentração de gordura de alguns produtos podem influenciar no aumento da resistência térmica da *Salmonella* (ICMSF, 2005), possibilitando sua sobrevivência a processos térmicos. Apesar do conhecimento da atuação desse patógeno como agente etiológico de doenças de origem alimentar e do risco que representa no setor chocolateiro, pouco se sabe sobre a presença de *Salmonella* em produtos brasileiros derivados do cacau e em chocolate. Maior ainda é a falta de informações sobre o comportamento desse patógeno nas diferentes etapas de processamento, como frente à competição microbiana natural presente na fermentação do cacau e aos diferentes

[Digite texto]

processamentos térmicos empregados durante o beneficiamento do cacau, o que justifica o presente trabalho, que teve como objetivo padronizar o inóculo de *Salmonella* em sementes, amêndoas e liquor de cacau para posterior análise do microorganismo durante o processamento do cacau e avaliar a resistência térmica da *Salmonella* durante a conchagem de chocolate ao leite empregando diferentes binômios de tempo x temperaturas.

Material e Métodos

Padronização dos inóculos

Para a padronização do inóculo de *Salmonella* nas diferentes amostras de cacau avaliadas ao longo do estudo, visando uma contaminação inicial entre 10^3 - 10^4 NMP/g ou 10^6 NMP/g foram avaliados inúmeros protocolos.

Conchagem

Os processos térmicos de conchagem avaliados foram: 50°C, 60°C e 70°C por 3, 8, 15 e 24 h. Foram realizados ensaios em duplicatas em bateladas de 500 g de mistura para chocolate ao leite. O monitoramento da temperatura foi realizado com auxílio de um termômetro calibrado em intervalos de 60 min. Em cada processo, foram coletadas amostras no tempo inicial e final para determinação da população de *Salmonella*.

Análise Microbiológica

Para a determinação da população de *Salmonella* foi utilizada, a técnica do Número Mais Provável (N.M.P.) de acordo com *Food and Drug Administration* (BAM/FDA, 2005). Um mililitro das diluições decimais foi transferido para tubos contendo 10 mL de leite desnatado reconstituído tamponado 10%, em série de três tubos, incubados a 37°C/24h. Em seguida foi realizado o enriquecimento em caldos Rappaport Vassiliadis (RV) e Tetrationato (TT), incubados a 42°C e 37°C/24h, respectivamente. O plaqueamento seletivo foi realizado em ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), com incubação a 37°C/24h. A confirmação foi feita através de provas bioquímicas e sorológicas.

Resultados e Discussão

Padronização do inóculo em diferentes amostras de cacau

A Tabela 1 apresenta os protocolos escolhidos para a padronização do inóculo em sementes, amêndoas secas e liquor de cacau. Visando a obtenção da população microbiana desejada, de 10^3 - 10^4 NMP/g, foram escolhidos como padrão para a inoculação de *Salmonella* em sementes de cacau o protocolo utilizando 250 g de amostra e 0,1 mL de inóculo com

escala de Mac Farland 1,0. Em liquor de cacau, o protocolo utilizado foi 75g de amostra e 0,5 mL de inóculo com escala de Mac Farland 0,5.

Para as amêndoas de cacau secas, a concentração de inóculo desejada foi de 10^6 NMP/g, por isso optou-se pela inoculação direta de cultivo de *Salmonella* nas amostras. Para esse procedimento foi adotado como protocolo padrão a inoculação direta de 0,5 mL cultivo de *Salmonella* após dupla propagação em BPW em 50 gramas de amêndoas de cacau. Após a inoculação, com o objetivo de não alterar a atividade de água inicial do produto, a amostra foi submetida à secagem em fluxo laminar por período de 10 min.

Tabela 1. Protocolos padronizados para a inoculação de *Salmonella* em diferentes produtos de cacau.

Produto	Amostra (g)	Volume do inóculo (mL)	Escala de Mac Farland	Adição de Tween 80 (gotas)	<i>Salmonella</i> (NMP/g)
Semente	250	0,1	1,0	-----	$2,5 \times 10^4$
Liquor	75	0,5	0,2	-----	1×10^4
Amêndoa seca	50	0,5	-----	3	$2,4 \times 10^6$

Determinação da resistência térmica de *Salmonella* durante a conchagem de chocolate ao leite

A Figura 1 apresenta a curva de redução térmica de *Salmonella* em chocolate ao leite durante a conchagem sob as temperaturas de 50°C, 60°C e 70°C, com duração de 3, 8, 15 e 24h.

Em relação à conchagem a 50°C, após 3 horas de processo, observou-se uma pequena redução (1 log NMP/10g) da população inicial. Com 8 horas ocorreu aumento de 1 ciclo logarítmico na redução, atingindo 1,83 log NMP/10g. Contudo, após 15 horas houve uma tendência à estabilização na morte microbiana, com ligeiro aumento da população final (3,7 log NMP/10g). O tempo de processo de 24 horas apresentou a maior redução bacteriana (2,10 log NMP/10g).

A 60° C, com o aumento do tempo de processo ocorreu um aumento gradativo na redução da população inicial do inóculo, de 1,76 após 3 horas a 4,35 após 24 horas.

Na temperatura de 70°C, a *Salmonella* apresentou um comportamento peculiar do ponto de vista de resistência térmica. Foi observada uma redução significativa após 3 horas (3,83 log NMP/10g). Porém, com o aumento do tempo de processo para 8 ou 15h não houve aumento considerável na redução da população inicial. Após 24 horas, a população do patógeno ficou abaixo do limite de detecção do método (<0,3 log NMP/10 g). Por esse motivo e com o objetivo de verificar a completa eliminação da *Salmonella*, foi realizada a análise de

[Digite texto]

presença/ausência em 100g de amostra. Em ambas as repetições foi observada a presença de *Salmonella* em 100g do produto, apesar da baixa população final ($<0,3 \log \text{NMP}/10 \text{ g}$ ou $<3 \log \text{NMP}/100\text{g}$).

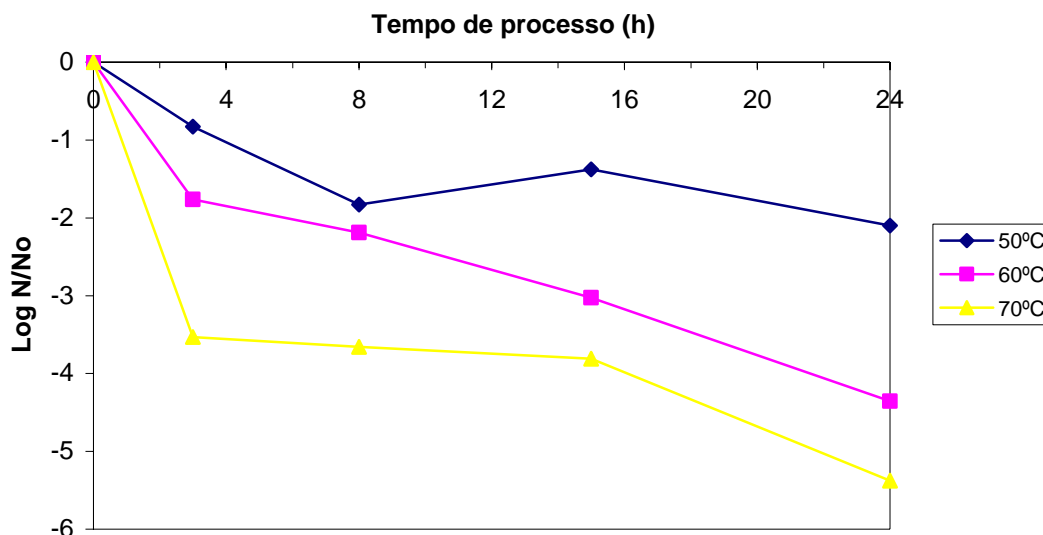


Figura 1. Curva de redução térmica da *Salmonella* spp. em chocolate ao leite durante a conchagem sob diferentes temperaturas: (◆) 50°C, (■) 60°C, (▲) 70°C, resultado de duplicata de amostras.

Com o aumento da temperatura de processo foram obtidas reduções progressivamente maiores da população de *Salmonella*, desta forma, quanto maior a temperatura em que for realizada a conchagem, maior será a redução do número de bactérias presentes no produto, todavia, o aumento do tempo de processamento não provoca necessariamente aumento na morte microbiana.

Como pôde ser observado, a *Salmonella* permaneceu presente nas amostras de chocolate ao leite mesmo após o processamento térmico de 24 horas, isso devido ao aumento da resistência térmica do patógeno provocada pela alta concentração de açúcar e baixos valores de a_w do chocolate.

A conchagem do chocolate é o último processamento térmico realizado em sua linha de produção, sendo assim, caso as matérias-primas utilizadas na produção do chocolate apresentem alta contaminação por *Salmonella*, esse processamento pode não ser capaz de eliminar a população residual, como comprovado através desse trabalho. Além disso, contaminações posteriores e este processo também não serão eliminadas do produto.

Portanto, para assegurar a segurança do consumo do chocolate quanto à ausência de *Salmonella* é necessário um controle rigoroso de todas as etapas do processamento do chocolate, incluindo a utilização de matéria-prima de qualidade, além da adoção de boas práticas de fabricação e limpeza nas plantas processadoras.

Conclusões

Os resultados demonstram que se a contaminação inicial em chocolate ao leite for alta ($>4 \log \text{ NMP/10g}$), a conchagem não pode garantir a eliminação completa de *Salmonella*, embora seja capaz de reduzir a população inicial.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

- BAM: Bacteriological Analytical Manual Online 2005. Chapter 5: *Salmonella*. ANDREWS, W.H., HAMMACK, T.S. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-5.html>>, acesso em 15/01/08.
- D'AOUST, J.Y. *Salmonella* and the chocolate industry. A review. J. Food Protection, v. 40, n. 10, p.718-727, 1977.
- ICMSF Cocoa, chocolate, and confectionery. In: Microorganisms in food, Volume 6: Microbial Ecology of Food Commodities. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, New York, 467-476, 2005.
- WERBER, D., DREESMAN, J., FEIL, F. *et al.* International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. *BMC Infectious Diseases*, v. 5, p.7-17, 2005.